

## 酿酒酵母 YPH499 III号染色体上 ARS 形成核小体能力的比较\*

赵秀娟 郑晓东 薛涛涛 蔡 禄\*\*

(内蒙古科技大学数理与生物工程学院 包头 014010)

**摘要** 核小体定位是复制起始调控的重要因素,但是核小体定位是如何调控真核生物的复制起始,目前还不是很清楚。研究酵母 III 号染色体上的不同活性复制起始序列形成核小体能力对探究真核生物 DNA 复制起始机制有着重要的生物学意义。酿酒酵母 III 号染色体上的 10 个复制起始序列分为高活性和低活性两组复制起始序列,利用核小体体外组装技术,将回收纯化的高活性和低活性复制起始序列分别与组蛋白八聚体在体外进行梯度盐透析组装形成核小体,并进行 Biotin 标记检测,然后用 Image J 软件分析不同复制起始序列组装形成核小体能力的强弱。结果表明,用 Image J 软件对核小体组装能力强弱进行分析:ARS304 > ARS303 > ARS313 > ARS302 > ARS306 > ARS314, ARS305, ARS307, ARS309, ARS315。低活性复制起始序列较高活性复制起始序列更易形成核小体;复制起始位点偏好出现于核小体缺乏区。

**关键词** 酿酒酵母 ARS 活性 核小体定位 核小体组装

**中图分类号** Q344

核小体在染色质结构上的定位可以调控基因表达、DNA 复制、转录等细胞生理过程。核小体是染色质结构组成的基本单位,它由约 165bp 碱基对的 DNA 序列和高度保守的八聚体组蛋白(组蛋白 H2A, H2B, H3 和 H4 各两分子)组成,其中约 147bp 碱基对缠绕核小体周围 1.65 圈,而 linker DNA 长约 20 ~ 50bp,核小体在组蛋白 H1 的作用下形成稳定结构,进一步折叠压缩为染色质的高级结构。其中,核心 DNA 和组蛋白八聚体结合形成核小体,阻碍细胞生理过程中蛋白调控因子识别和结合核心 DNA,而 linker DNA 则有可能识别结合这些蛋白因子,完成基因表达、DNA 复制、修复和转录调控等过程。目前认为核小体的定位与 DNA 序列和染色质重塑因子复合物相关。如在人、酵母及线虫染色质上核小体的分布极不均匀,特别是复制起始位点偏好出现于核小体缺乏区<sup>[1-3]</sup>;还有研究表明在酵

母染色体中,核小体优先定位于定位在 AA/TT 富集的区域;而在果蝇染色体中,核小体优先定位在 CC/GG 富集的区域<sup>[4]</sup>。核小体定位是如何调控真核生物的复制起始,目前还不是很清楚。

核小体的定位与复制子活性有关。研究认为复制起始位点偏好出现于核小体缺乏区,Newlon 等对酵母 III 号染色体上 19 个自主复制序列 ARS (autonomously replicatory sequences, ARS) 的复制活性及有无核小体的定位进行了统计分析发现,10 个低活性 ARS 位于核小体占据率较高区域;5 个高活性 ARS 位于核小体占据率较低区域,相邻较近的 ARS304 和 ARS305 均有核小体覆盖,但活性有较大差异<sup>[5-7]</sup>。

核小体在局部染色质上的精确定位调控着细胞核的生理过程,如在 ARS1 的穿核质粒上核小体重新排列定位,再用微球菌核酸酶消化和探针杂交,结果显示 ACS 处无核小体定位<sup>[8]</sup>;还有研究表明在 ACS 处,不仅无核小体定位,而且在 ACS 两侧,核小体的位置也影响着复制子的活性,将 ACS 两侧的核小体去除或移位虽然不会干扰 ORC 识别结合复制起始位点,但抑制复制

收稿日期:2014-09-20 修回日期:2014-10-23

\* 国家自然科学基金(61361014),内蒙古自然科学基金(2011MS0504)资助项目

\*\*通讯作者,电子邮箱:nmcailu@163.com

起始复合物的形成<sup>[9]</sup>;用高通量测序技术对酵母基因组及质粒上 ARS 两侧序列进行测序,表明核小体在 ARS 两侧的分布具有一定的规律,即复制起始位点分布于核小体缺乏区,并且呈现不均匀的模式,原因可能是 ORC 在识别结合 ARS 过程中需要 ARS 两侧核小体的精确定位<sup>[10]</sup>。

利用盐透法在体外进行核小体组装可以探究核小体在复制子上的定位机制,该方法在体外进行核小体组装的优点是组装体系中没有其他蛋白因子,对后续的研究不会产生影响,因此利用盐透析法可以对依赖于 DNA 序列信息的核小体定位机制进行研究。

为进一步研究酿酒酵母不同 ARS 与核小体占据率的关系,本研究利用盐透法在体外进行依赖于 ARS 序列的核小体组装,并结合 ImageJ 软件分析每条 ARS 序列组装形成核小体能力的强弱。研究酵母 III 号染色体上的不同活性复制起始序列形成核小体能力对探究真核生物 DNA 复制起始机制有着重要的生物学意义。

## 1 材 料

### 1.1 试剂与溶液

通用显影粉和酸性定影粉购自天津市世纪奥博商贸有限公司;Streptavidin-AP Conjugate、CDP-Star 购自 Roche 公司;Amersham Hybond™-N<sup>+</sup> 购自 GE Healthcare 公司;DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司。

50 × TAE 电泳缓冲液:称取 24.2 g Tris 溶于 40 ml 去离子水中,加入 5.71 ml 冰醋酸和 10 ml 0.5 mol/L EDTA,再加去离子水定容至 100 ml,室温保存备用。

2 mol/L NaCl:52.6 g NaCl,9 ml 50 × TE 加灭菌水定容至 450 ml;

1 mol/L Tris-Cl:将 24.22 g Tris,加入 150 ml 水中溶解,浓盐酸调 pH 为 9.5,加灭菌水定容至 200 ml;

10% SDS:将 50 g SDS 加入 30 ml 水中溶解,68 ℃ 水浴加热溶解,加灭菌水定容至 500 ml;

Block solution:组分:5% SDS、125 mmol/L NaCl、17 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、8 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>;

Detection Buffer:组分:0.1 mol/L Tris-Cl(pH 9.5)、0.1 mol/L NaCl;

Native loading Buffer:50% glycerol、0.1% 溴酚蓝溶于 0.5 × TBE 中;

组蛋白八聚体各组分是由含有 H2A、H2B、H3 和 H4 基因的重组质粒转化入大肠杆菌后经诱导表达、纯化、复性获得的,最后又经分子筛柱纯化,其终浓度为

3.96 μg/μl。

### 1.2 仪器与器皿

凝胶成像仪、PCR 仪、凝胶成像仪、电子恒温水浴锅、数控层析冷柜、恒磁力加热搅拌器、恒流泵等。

## 2 方 法

### 2.1 ARS 序列的获得

2.1.1 ARS 序列引物设计 在 SGD 数据库中获得 III 染色体的 ARS 序列信息,选取以下这 10 条 ARS 序列并对每条序列截取 300 bp 左右,根据各 ARS 序列信息分别设计引物,如表 1 所示,每对 ARS 序列的 Forward 引物都为 5'端不带 Biotin 标记的和 Biotin 标记两种。

表 1 10 条 ARS 的引物设计序列

Table 1 10 ARS primers

ARS	引物序列(5'→3')
ARS302	Forward GCTTATTGCTGCTTTGTT
	Reverse TAAGGTACAGTGTCATG
ARS303	Forward TCTAATAAATGAAGTAAG
	Reverse CAGCTTGAATCTTAATC
ARS304	Forward GACGACGTAAATATAGTCTCTG
	Reverse TCTCGACTTAGTACACCTG
ARS305	Forward ATGGGAATATCGTGTAAGC
	Reverse TCAAAGTGGCCGGTCTT
ARS306	Forward TTTGTAACGCGATTGTA
	Reverse AACAGGAAATTCGCATAT
ARS307	Forward AATGAAACTTTGATGTCCTCTT
	Reverse GTCCATGTGCTACTGCTTTT
ARS309	Forward CAGCAAAAAAGTGAAGT
	Reverse AACGAGAACTATTGAAAT
ARS313	Forward TGCCACTGTATAAAGATGT
	Reverse ACTGCTATTTCTATGACC
ARS314	Forward TAGCCTAAAGATACGGTAATTG
	Reverse CAGGGCGTATCAAGTCAGTAT
ARS315	Forward GTGGGTATTTCCGTGTAT
	Reverse CAAGGTAGATATGTATTAGAA

2.1.2 ARS 序列扩增 PCR 反应体系如表 2 所示。

表 2 PCR 反应体系

Table 2 The PCR reaction system

PCR 各组分	体积(μl)
10xPCR Buffer	5
2.5 mmol/L dNTP	4
P(forward)(10 μmol/μl)	1
P(reverse)(10 μmol/μl)	1
YPH499 的基因组 DNA(约 500 ng)	1
Taq DNA 聚合酶(5 U/μl)	0.25
ddH <sub>2</sub> O	37.7

PCR 反应程序:在 94 ℃ 预变性 5 min,进入循环扩增阶段:94 ℃ 30 s → 退火 45 s → 72 ℃ 45 s,循环 30 次,最后在 72 ℃ 再延伸 10 min,4 ℃ 保存。(ARS302, ARS303, ARS304, ARS305, ARS306, ARS307, ARS309, ARS313, ARS314 和 ARS315 退火温度分别为:40 ℃, 45 ℃, 45 ℃, 50 ℃, 47 ℃, 50 ℃, 50 ℃, 52 ℃, 50 ℃ 和 48 ℃)。

**2.1.3 ARS 序列回收纯化** 将 PCR 产物经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色后,用干净的手术刀将目的 DNA 片段准确地切割下,进行胶回收,胶回收的详细步骤参见上海生工的 San Prep 柱式 DNA 胶回收试剂盒说明。在  $OD_{260/280nm}$  处,回收的 ARS 序列用紫外分光光度计测定其吸光值,每条 ARS 序列测定三次,取平均值;配制 1.5% 的琼脂糖凝胶,取 PCR 产物各 300 ng,在 100 V 电压下电泳分离 PCR 产物,EB 染色拍照观察,确保胶回收纯化后的 10 对 DNA 序列的条带清楚,位置正确,无非特异性条带。

**2.1.4 ARS 序列浓度检测** DL1000 DNA Marker 由 DNA 片段 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 700 bp, 1 000 bp 组成,进行琼脂糖凝胶电泳时取 5  $\mu$ l Marker 点样,其中 400 bp 条带最亮,其 DNA 量约为 150 ng,其余条带的 DNA 量约为 50 ng,本研究对胶回收纯化后的每条 ARS 序列分别取 50 ng 和 150 ng 与 5  $\mu$ l 的 DL1000 DNAMarker 作为对照,进行琼脂糖凝胶电泳分离,观察每条 ARS 序列的亮度,如果实验组和对照组有明显差异,进一步用紫外分光光度计测定每条 ARS 序列的浓度。

## 2.2 ARS302 序列体外组装体系的摸索

整个过程均在 4 ℃ 或冰上操作,防止组蛋白变性或核小体解聚。

将回收纯化的无 Biotin 标记的和带 Biotin 标记的 ARS302 序列按质量比 1:1 进行混合,利用紫外分光光度计进行 3 次浓度测定,取其平均值;用灭菌去离子水将组蛋白八聚体的浓度从 3.96  $\mu$ g/ $\mu$ l 稀释为 0.396  $\mu$ g/ $\mu$ l;取 1  $\mu$ g 的 ARS302 DNA 进行体外组装,建立如表 3 的组装反应体系;在截留分子质量为 6 ~ 8 kDa 的透析管中加入反应体系,此时 NaCl 终浓度为 2 mol/L;将透析管放入装有 450 ml 的 2 mol/L NaCl/TE 缓冲液的烧杯中;在层析冷柜中,将转子放入烧杯中,置于磁力搅拌器上,开启恒流泵,转速为 24 r/min;利用恒流泵将 1 050 ml 的 1  $\times$  TE 缓冲液缓慢泵入到 2 mol/L NaCl/TE 缓冲液中,2 mol/L NaCl/TE 缓冲液的浓度逐步稀释

为 0.6 mol/L,整个过程在 4 ℃ 透析 16 h 以上。倒掉 0.6 mol/L NaCl/TE 缓冲液,取出透析管置于 800 ml 的 1  $\times$  TE 缓冲液中继续透析 3 h 以上;将透析管中样品转移到遇冷的灭菌后的 EP 管中,用 1  $\times$  TE 调整为等体积,4 ℃ 保存,用于核小体组装检测分析。

表 3 ARS302 体外组装反应体系

Table 3 ARS302 assembly system *in vitro*

Ratio( octamer/DNA)	0.8	1.2	1.6
V( DNA <sub>ARS302</sub> )	7.25 $\mu$ l	7.25 $\mu$ l	7.25 $\mu$ l
V( otamer)	2.02 $\mu$ l	3.03 $\mu$ l	4.04 $\mu$ l
V( 5mol/L NaCl)	24 $\mu$ l	24 $\mu$ l	24 $\mu$ l
V( 1 $\times$ TE)	26.73 $\mu$ l	25.72 $\mu$ l	24.71 $\mu$ l
总体积	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l	60 $\mu$ l

## 2.3 ARS302 核小体组装检测

按照表 4 配方,制备 5% 的 native page 胶,在层析冷柜中,取 1/10 组装后的样品与 Native loading buffer 混合后点样,经 5% native page 胶分离,电泳缓冲液为 0.5  $\times$  TBE 缓冲液;在 100 V 的电压下,当凝胶中的溴酚蓝泳动至距凝胶底部 1 ~ 2 cm 时停止电泳;在转膜仪底面凹槽内加满 0.5  $\times$  TBE 溶液,轻轻取下凝胶,将带正电荷的尼龙膜贴在凝胶上,小心地将胶从玻璃板上剥离,在凝胶下面铺三层浸湿的滤纸,并在尼龙膜上再铺三层浸湿的滤纸,25 mA 转膜 36 min;将膜正面朝上放入紫外交联仪中,当紫外交联从 5 J 降至 2 J 以下停止;取出尼龙膜放入盛有 Blocking Buffer 的小盒子里,置于水平摇床上至少封闭 1 h 或过夜;倒掉 Blocking Buffer,加入 Streptavidin-AP 抗体稀释液(用 15 ml Blocking buffer 稀释 1  $\mu$ l Streptavidin-AP 抗体),进行抗体孵育 45 min;倒掉抗体稀释液,加入适量的 Wash buffer 洗膜 5 次,每次 10 min;将膜平铺在 X 射线摄影暗匣内,将底物 CDP-STAR 稀释液(用 398  $\mu$ l Detection solution 稀释 2  $\mu$ l 底物 CDP-STAR)均匀滴于膜的正面,孵育 1 ~ 2 min;在暗室中,剪一块 X 光胶片,进行压片、显影、定影,然后将胶片取出用清水清洗。

表 4 Native page 胶(5%)的制备

Table 4 Preparation of native page gel(5%)

5% native page 各组分	体积(ml)
30% 丙烯酰胺溶液( Acr: Bis = 29:1 )	24
5 $\times$ TBE	2.4
10% 过硫酸氨	0.168
TEMED	0.008 4
加 ddH <sub>2</sub> O 至 24ml	

2.4 10 条 ARS 序列的体外组装

每条 ARS 序列的 DNA 的组装体系如表 5 和 6 所示。

10 条 ARS 序列 DNA 的体外组装操作步骤同 2.2,

表 5 低活性 ARS 序列体外组装反应体系

Table 5 Low activity ARS sequence assembly reaction system *in vitro*

体系中的各组分	ARS302	ARS303	ARS304	ARS313	ARS314
V(DNA <sub>ARS</sub> )	7.25 μl	12.7 μl	8 μl	7.20 μl	8.20 μl
V(otamer)	4.04 μl	4.04 μl	4.04 μl	4.04 μl	4.04 μl
V(5mol/L NaCl)	24 μl	24 μl	24 μl	24 μl	24 μl
V(1 × TE)	24.71 μl	19.26 μl	23.96 μl	24.76 μl	23.76 μl
总体积	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl

表 6 高活性 ARS 序列体外组装反应体系

Table 6 Highly active ARS sequence assembly reaction system *in vitro*

体系中的各组分	ARS305	ARS306	ARS307	ARS309	ARS315
V(DNA <sub>ARS</sub> )	9.80 μl	10.42 μl	7.00 μl	8.27 μl	6.33 μl
V(otamer)	4.04 μl	4.04 μl	4.04 μl	4.04 μl	4.04 μl
V(5mol/L NaCl)	24 μl	24 μl	24 μl	24 μl	24 μl
V(1 × TE)	22.16 μl	21.54 μl	24.96 μl	23.69 μl	25.63 μl
总体积	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl	60 μl

2.5 10 条 ARS 序列的核小体组装检测

在层析冷柜中,取 1/10 组装后的样品进行 5% 的 native page 凝胶电泳分离,转膜、紫外交联、封闭、抗体反应、清洗、加底物及曝片的操作步骤同 2.3。

2.6 ARS 序列组装能力分析

用 Image J 软件对组装图片进行电泳条带灰度比分析,比较不同 ARS 形成核小体能力的强弱。核小体组装强度 A,用如下公式计算: A = 被核小体缠绕的 DNA/自由的 DNA,式中,对每条 ARS 序列来说,自由的 DNA 表示未组装形成核小体的 DNA。

3 结果与讨论

3.1 ARS 序列信息的分析

我们为进一步研究Ⅲ号染色体的 ARS 活性与其序列特征的关系,运用 SGD 数据库及生物信息学等手段在 SGD 数据库中获得Ⅲ号染色体的 10 条 ARS 序列信息,将这些序列分别截取 300 bp 左右,得到 ARS 序列的位置、GC%、有无 ACS 序列等信息,统计如表 7 所示,这 10 条 ARS 序列的 GC% 没有太大差异,都在 30% 左右,ACS 是 ARS 起始 DNA 复制的核心序列,其中 6 个低活性 ARS 中 4 个有 ACS,高活性的 5 个 ARS 中 4

个有 ACS,这表明有无 ACS 不能作为鉴别 ARS 活性高低的唯一标准。由表 7 可知虽然大部分 ARS 序列都有 ACS,但其在 ARS 序列上位置不同,这可能是导致 ARS 活性不同的原因之一。

3.2 ARS 序列的 PCR 扩增

在获得 ARS 序列时,需要进行大量 PCR 和 DNA 回收纯化,以 YPH499 酵母基因组 DNA 为模板,分别以 10 对引物进行 PCR,获得 300 bp 左右的目的片段 DNA,取 5 μl PCR 产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离检测,结果如图 1 和 2 所示:目的片段 DNA 位置正确,条带清楚。在 PCR 过程中,要从引物,模板及退火温度等方面进行优化,特别是 PCR 模板的量不需要太多,否则会出现严重的拖尾现象。

3.3 胶回收纯化 ARS 序列

将目的片段 DNA 准确切割下来,在进行胶回收纯化时,电泳缓冲液用 1 × TAE,切割目的条带时要尽量准确,溶胶时要迅速,确保 DNA 回收的浓度和质量。取纯化后的产物各 300 ng,在 100 V 电压下经 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,EB 染色拍照观察,如图 3 所示,10 对 DNA 序列的条带清楚,位置正确,无非特异性条带。

表 7 酵母Ⅲ号染色体 10 条 ARS 序列信息  
Table 7 10 ARS sequence information of Yeast chromosome III

活性	特征 ARS	ARS 位置	GC%	ACS 序列	ACS 位置	ARS 长度 bp
低活性	ARS302	14575-14849	31.3	+ (TTTTATATTTT)	127 ~ 137	291
	ARS303	14871-15213	31.6	+ (ATTTATATTTT)	316 ~ 326	294
	ARS304	30200-30657	32.5	+ (TTATAAATTTT)	230 ~ 240	303
	ARS313	194265-194513	32.1	—	—	303
	ARS314	197378-197609	28.0	—	—	292
	ARS305	39159-39706	33.0	+ (TTATATGTTTT)	421 ~ 431	293
高活性	ARS306	74458-74677	30.0	+ (ATTTATATTTA)	64 ~ 74	291
	ARS307	108780-109295	35.7	+ (ATTTATGTTTT)	181 ~ 191	303
	ARS309	131985-132328	27.6	+ (GTTTATATCTT)	62 ~ 72	301
	ARS315	224816-225061	31.7	—	—	303

“+” represents the ACS sequence, “-” represents no ACS sequence

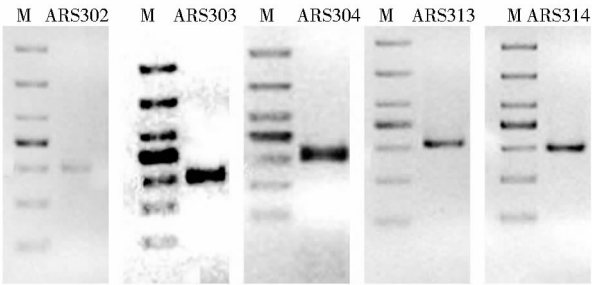


图 1 低活性 ARS 序列胶回收纯化结果图  
Fig. 1 The recovery and purification result of low activity ARS sequence

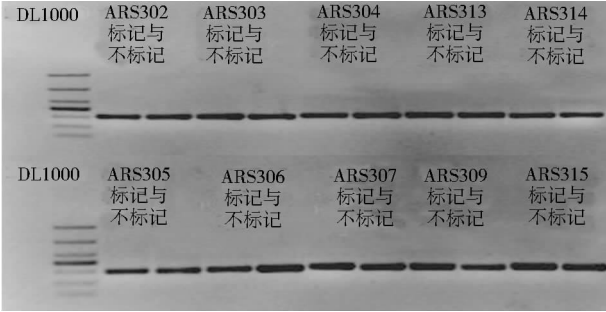


图 3 目的片段 ARS302-ARS315 经切胶回收后电泳检测结果  
Fig. 3 Electrophoresis test results of ARS302 - ARS315 recycling

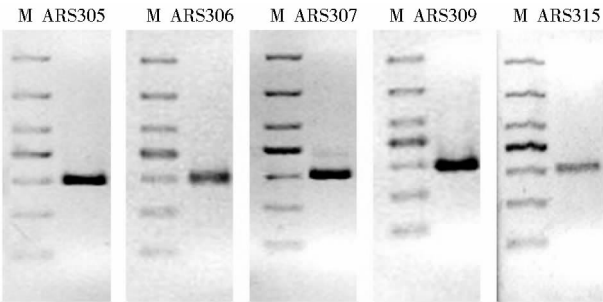


图 2 高活性 ARS 序列胶回收纯化结果图  
Fig. 2 The recovery and purification result of highly activity ARS sequence

3.4 ARS 序列的质量与浓度检测

对胶回收纯化后的每条 ARS 序列分别取 50 ng 和 150 ng 与 5 μl 的 DL1000 DNA Marker 作比较,进行琼脂糖凝胶电泳分离,比较每条 ARS 序列的亮度,如图 4

和图 5 所示,对每条 ARS 序列来说,150 ng 的 DNA 量与 Marker 的 400 bp 条带亮度无明显差异,50 ng 的 DNA 量也与 Marker 的其他条带亮度无明显差异,这表明每条 ARS 序列带 Biotin 标记和不带 Biotin 标记的的 DNA 浓度测量基本准确。

将每条 ARS 序列带 Biotin 标记和不带 Biotin 标记的 DNA 样品混合后用紫外-可见分光光度计测定 DNA 纯度和浓度,每条 ARS 序列的浓度测量 3 次,取平均值,由表 8 可知,每条 ARS 序列的纯度和浓度都可以进行核小体体外组装。

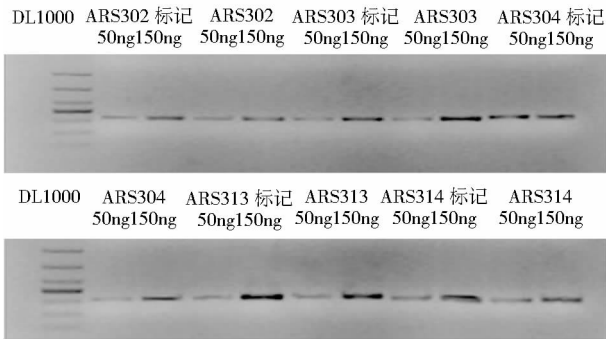


图 4 低活性 ARS302-ARS314 序列  
的浓度检测电泳图

Fig. 4 The concentration test of low activity  
ARS302 - ARS314 sequence

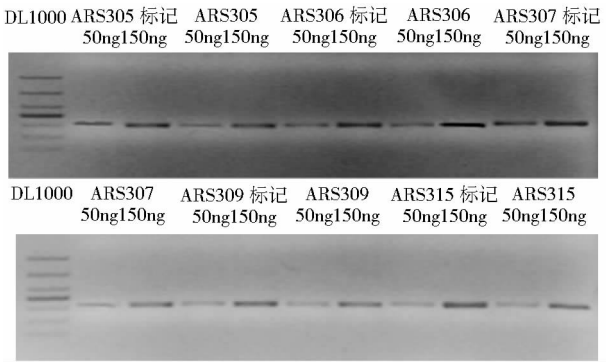


图 5 高活性 ARS305-ARS315 序列  
的浓度检测电泳图

Fig. 5 The concentration test of highly  
activity ARS305 - ARS315 sequence

表 8 目的片段的纯度、浓度及质量

Table 8 The purity、concentration and  
quality of purpose fragment

ARS 序列	DNA	目的序列混合后的浓度	OD <sub>260/280</sub>
ARS302		138 ng/ μl	1.84
ARS303		79 ng/ μl	1.78
ARS304		125 ng /μl	1.83
ARS313		139 ng /μl	1.85
ARS314		122 ng /μl	1.80
ARS305		102 ng /μl	1.81
ARS306		96 ng /μl	1.82
ARS307		143 ng /μl	1.80
ARS309		121 ng /μL	1.84
ARS315		158 ng /μL	1.87

3.5 ARS302 的核小体体外组装结果

将组蛋白八聚体与 ARS302 序列按 0.8、1.2 与 1.6 的比例组装后,分别取组装后样品总体积的 1/10 进行 5% native page 电泳,用 ARS302 序列 DNA 序列作为对照,接着进行转膜、紫外交联、封闭、抗体孵育、底物反应及曝光,结果如图 6 所示,利用 ARS302 序列建立体外组装体系,并通过 Biotin 标记检测发现组蛋白与 DNA 比例为 1.6 时组装效果较好,组装比例为 0.8 和 1.2 时,核小体未能组装上,重复实验 3 次。组装比例为 1.6 时比较接近生理状态下组蛋白与 DNA 的比例,作为条件摸索,以后将组蛋白八聚体与每条 ARS 序列按 1.6 的比例进行组装。但是,核小体体外组装比例和更灵敏的核小体检测方法还需进一步摸索。

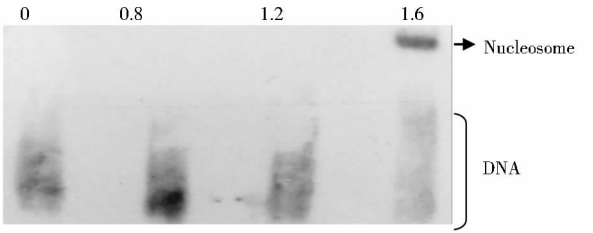


图 6 ARS302 序列体外形成核小体的结果

Fig. 6 Result of ARS302 sequence  
forming nucleosome *in vitro*

3.6 10 条 ARS 序列的体外组装检测

将组蛋白八聚体与每条 ARS 序列按 1.6 的比例进行组装后的结果如图 7 和 8 所示,对低活性 ARS 来说,ARS302,ARS303,ARS304 与 ARS313 都和组蛋白八聚体形成了核小体,而 ARS314 基本没有形成核小体;对高活性的 ARS 来说,只有 ARS306 形成了微弱的核小体,其它高活性的 ARS 序列没有形成核小体。

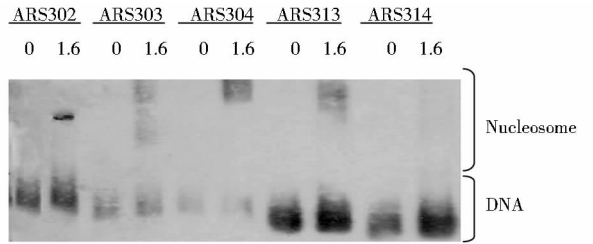


图 7 低活性 ARS302-ARS314 序列  
体外形成核小体结果

Fig. 7 Result of low activity ARS302 - ARS314  
sequence forming nucleosome *in vitro*

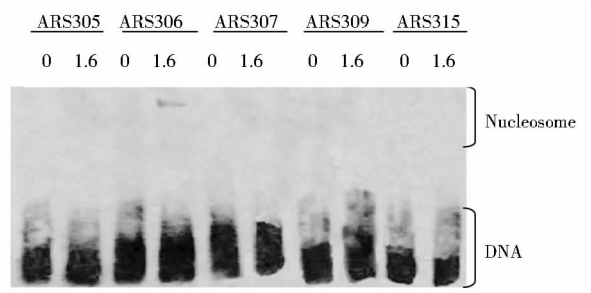


图 8 高活性 ARS305-ARS315 序列体外形成核小体的结果

Fig. 8 Result of highly activity ARS305 - ARS315 sequence forming nucleosome *in vitro*

**3.7 10 条 ARS 序列组装形成核小体能力的比较**

用 Image J 软件对 10 条 ARS 序列中被核小体缠绕的 DNA 进行定量比较,结果如表 9 所示。

通过 Image J 软件分析 ARS304 核小体组装强度为 2.989,能力最强,ARS303 核小体组装强度为 1.395, ARS313 核小体组装强度为 0.714,ARS302 核小体组装强度为 0.706, ARS306 核小体组装强度为 0.031, ARS314, ARS305, ARS307, ARS309 和 ARS315 核小体组装强度都为 0,即 ARS 形成核小体能力强弱:ARS304 > ARS303 > ARS313 > ARS302 > ARS306 > ARS314, ARS305, ARS307, ARS309, ARS315。总体来说,低活性

表 9 10 条 ARS 序列组装形成核小体能力

Table 9 The ability of 10 the ARS sequence forming nucleosome

ARS	被核小体缠绕的 DNA 的 band 值	自由 DNA 的 band 值	核小体组装强度
ARS302	205.177	290.533	0.706
ARS303	179.686	128.879	1.395
ARS304	197.567	66.102	2.989
ARS313	253.451	354.821	0.714
ARS314	0	265.636	0
ARS305	0	316.005	0
ARS306	18.987	609.819	0.031
ARS307	0	510.104	0
ARS309	0	805.325	0
ARS315	0	286.292	0

ARS 较高活性 ARS 的核小体组装能力强。ARS 在复制起始时,复制起始位点激活需要多种复制起始蛋白因子及 ORC 的参与,核小体占据会阻碍复制起始位点的激活,因而高活性的 ARS 较低活性的 ARS,核小体组装能力弱些。

参考文献

[ 1 ] Lee W, Tillo D, Bray N, et al. A high-resolution atlas of nucleosome occupancy in yeast. *Nat Genet*, 2007, 39 ( 10 ): 1235-1244.

[ 2 ] Audit B, Zaghoul L, Vaillant C, et al. Open chromatin encoded in DNA sequence is the signature of ‘master’ replication origins in human cells. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37(18) :6064-6075.

[ 3 ] Hagerman K A, Ruan H, Edamura K N, et al. The ATTCT repeats of spinocerebellar ataxia type 10 display strong nucleosome assembly which is enhanced by repeat interruptions. *Gene*, 2009, 434(1-2) :29-34.

[ 4 ] Jiang C, Pugh B F. A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome Biol*, 2009, 10(10) :R109.

[ 5 ] Theis J F, Dershowitz A, Irene C, et al. Identification of mutations that decrease the stability of a fragment of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III lacking efficient replicators. *Genetics*, 2007, 177(3) :1445-1458.

[ 6 ] Irene C, Maciariello C, Cioci F, et al. Identification of the sequences required for chromosomal replicator function in *Kluyveromyces lactis*. *Mol Microbiol*, 2004, 51(5) :1413-1423.

[ 7 ] Theis J F, Newlon C S. Two compound replication origins in *Saccharomyces cerevisiae* contain redundant origin recognition complex binding sites. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(8) :2790-2801.

[ 8 ] Simpson R T. Nucleosome positioning can affect the function of a cis-acting DNA element *in vivo*. *Nature*, 1990, 343(6256) :387-389.

[ 9 ] Lipford J R, Bell S P. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell*, 2001, 7(1) :21-30.

- [10] Eaton M L, Galani K, Kang S, et al. Conserved nucleosome positioning defines replication origins. *Genes Dev*, 2010, 24 (8):748-753.

## Comparison of ARS Element Forming Nucleosome on *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 III Chromosome *in vitro*

ZHAO Xiu-juan ZHENG Xiao-dong XUE Tao-tao CAI Lu

(School of Mathematics Physics and Biological Engineering, Inner Mongolia University of Science and Technology, Baotou 014010, China)

**Abstract** The regulation of DNA replication initiation sites has a guarantee for DNA replication and cell division. Nucleosome positioning is an important factor for the regulation of DNA replication initiation sites. But it is not clear that how nucleosome positioning regulates DNA replication initiation. It has important biological significance to understand the mechanism of DNA replication initiation. In the study, ten autonomously replicating sequences (ARS) of *Saccharomyces cerevisiae* YPH499 III chromosome were divided into efficient and inactivity groups. These aim sequences were amplified by PCR, then recycled and purified using TIANgel Maxi Purification kit. A gradient salt dialysis method was employed to assemble nucleosome *in vitro*, then nucleosome depended on the purpose sequence were analyzed with Biotin labeling method. The ability of forming nucleosome was analyzed with Image J software. The result showed that nucleosome assembly strength which was analysed by Image J software is respectively 0.706, 1.395, 2.989, 0, 0.031, 0, 0, 0.714, 0 and 0 from ARS302 to ARS315. In other words, nucleosome assembly strength was as follows: ARS304 > ARS303 > ARS313 > ARS302 > ARS306 > ARS314, ARS305, ARS307, ARS309, ARS315. The results indicated the inactive ARS were more likely to form nucleosome than the efficient ARS; Replication initiation sites often show a nucleosome-depleted region.

**Key words** *Saccharomyces cerevisiae* ARS Nucleosome positioning Nucleosome assembly